Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse

Code K5001

5th edition/ 5ème édition/ 5. Ausgabe

For use with Dako automated immunostaining instruments.
The kit contains reagents sufficient for 500 tests.

Pour utilisation avec les automates de coloration Dako.
Ce kit contient les réactifs nécessaires pour 500 tests.

Zur Verwendung mit Dako Immunfärbeautomaten.
Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 500 Tests.

Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use 4
Summary and Explanation 4
Reagents 5
A. Materials provided 5
B. Materials required but not provided 5
Precautions 6
Storage 6
Reagent Preparation 6
Specimen Collection and Preparation 6
Procedure 7
Quality Control 8
Interpretation of Results 8
Explanation of symbols 20

FRANÇAIS

Utilisation prévue 9
Résumé et explication 9
Réactifs 10
A. Matériels fournis 10
B. Matériels requis mais non fournis 10
Précautions 11
Conservation 11
Préparation des réactifs 12
Prélèvement et préparation des échantillons 12
Procédure 12
Contrôle qualité 14
Interprétation des résultats 14
Explication des symboles 20

DEUTSCH

Verwendungszweck 15
Zusammenfassung und Erklärung 15
Reagenzien 16
A. Mitgelieferte Materialien 16
B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material 16
Vorsichtsmaßnahmen 17
Aufbewahrung 17
Reagenzvorbereitung 17
Entnahme und Vorbereitung der Probe 18
Verfahren 18
Qualitätskontrolle 19
Auswertung der Ergebnisse 19
Erläuterung der Symbole 20

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, is intended for use in immunohistochemistry together with Dako automated immunostaining instruments. The kit is based on the LSAB (labeled streptavidin-biotin) method and is employed in a three step procedure. The first step is incubation of the tissue with an optimally diluted primary rabbit or mouse antibody, the second step is incubation with Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), and the third step is incubation with Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP). The reaction is visualized by Dako REAL™ DAB+ chromogen which is also included in the kit. To ensure a proper staining, it is recommended to use the kit in conjunction with other recommended reagents – listed in the section “Materials required but not provided”.

Summary and Explanation

Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, has been designed to give optimal staining on Dako automated immunostaining instrument, when using the templates/protocols advised in this package insert.

Prior to staining some routinely fixed, paraffin-embedded tissue sections should be subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER) using the Target Retrieval Solution specified in the package insert for the primary antibody. Some primary antibodies require enzymatic pre-treatment of tissue for optimal staining instead of HIER. Please note that Dako REAL™ Proteinase K, code S2019, is designed to be used in combination with HIER in order to ease batch processing of the slides.

Endogenous peroxidase should be blocked with Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, code S2023, or Dako Dual Endogenous Enzyme Block, code S2003.

Due to an effective washing procedure and the presence of stabilizing proteins in the Dako reagents, extra blocking steps to reduce non-specific background staining are unnecessary. Dako Wash Buffer specific for the individual Dako instruments is recommended.

Primary antibodies are not provided with the kit. We recommend the use of Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies or Dako concentrated Primary Antibodies.

Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, is based on an indirect streptavidin-biotin method, which has been shown to provide an increased sensitivity compared with analogous methods. The biotinylated secondary antibody reagent of the kit reacts equally well with rabbit and mouse immunoglobulins, thus only one secondary reagent is required for rabbit or mouse primary antibodies. The secondary antibody reagent has been optimally labeled with biotin using a 7-atom spacer arm. This allows each biotinylated antibody molecule to react with several peroxidase-conjugated streptavidin molecules and thereby increases the sensitivity of the detection system. The peroxidase-conjugated streptavidin of the kit is prepared from streptavidin isolated from *Streptomyces avidinii*, and highly purified horseradish peroxidase. The conjugation is performed by a refined two-step glutaraldehyde method. Because the isoelectric point of streptavidin is close to neutral, non-specific ionic interactions with specimen components are avoided. The biotinylated secondary antibody reagent as well as the peroxidase-conjugated streptavidin is provided as ready-to-use in dropper bottles and has to be poured into appropriate instrument containers before use.

The substrate system consists of two components, DAB+ Chromogen, a concentrated diaminobenzidine (DAB) solution, and HRP Substrate Buffer containing hydrogen peroxide. Before use, DAB+ Chromogen must be diluted in HRP Substrate Buffer. The substrate system produces a crisp brown end product at the site of the target antigen.

Dako REAL™ Hematoxylin, code S2020 or Hematoxylin for the Dako Autostainer, code S3301, is recommended for counterstaining as they provide a clear blue, nuclear staining.

The stained tissue sections may be mounted with either aqueous or organic-solvent-based mounting medium.

Reagents

A. Materials provided

Bottle A

LINK, BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODIES (AB2)

Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)
100 mL, ready-to-use
Biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and sodium azide.

The color of this reagent may vary from strong yellow to colorless without having any influence on the performance of the kit.

Bottle B

STREPTAVIDIN PEROXIDASE (HRP)

Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)
100 mL, ready-to-use
Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.

Bottle C

DAB+ CHROMOGEN (X 50)

Dako REAL™ DAB+ Chromogen
5 mL, 50x concentrated
3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.

The color of this reagent may vary from strong violet to colorless without having any influence on the performance of the kit.

Bottle D

HRP SUBSTRATE BUFFER

Dako REAL™ HRP Substrate Buffer
250 mL, ready-to-use
Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

B. Materials required but not provided

Dako automated immunostaining instruments

Dako Wash Buffer specific for the individual instrument

Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, code S2023, or Dual Endogenous Enzyme Block, code S2003

Dako REAL™ Proteinase K, code S2019, diluted in Dako REAL™ Proteinase K Diluent, code S2032, or Proteinase K (Ready-to-Use), code S3020 (if necessary)

Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies or alternative concentrated primary rabbit or mouse antibodies from Dako

N-Series Ready-to-Use Rabbit or Mouse Universal Negative Control or suitable negative control reagent for the primary antibody

Dako REAL™ Antibody Diluent, code S2022 (for dilution of concentrated antibodies)

Dako REAL™ Hematoxylin, code S2020 or Hematoxylin for the Dako Autostainer, code S3301

Target Retrieval Solution. See package insert of the primary antibody

Dako REAL™ Incubation Container, code S2030 (optional)

Dako REAL™ Slide Holder, code S2029 (optional)

Dako instrument utensils

Microscope slides

General laboratory reagents for dewaxing paraffin-embedded tissue sections

Mounting medium (aqueous or organic-solvent-based) and coverslips

Precautions

1. For professional users.
2. Bottle A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), contains material of mammalian origin. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
3. Bottle A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
4. Do not expose Bottle C, Dako REAL™ DAB+ Chromogen or the Substrate Working Solution (CHROM) to strong light.
5. Bottle C, Dako REAL™ DAB+ Chromogen, contains 1–5 % 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid, and is labeled:
   Harmful.
   R40 Limited evidence of carcinogenic effect.
   R43 May cause sensitisation by skin contact.
   R68 Potential risk of irreversible effects.
   S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
   S33/37 Wear suitable protective clothing and gloves.
   As a main rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper working procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.
6. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
7. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store the kit at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on the kit. Do not interchange kit components from different lots. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. The prepared Substrate Working Solution (CHROM) should be stored at 2–8 °C and used within 5 days. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services.

Reagent Preparation

Substrate Working Solution **(CHROM)**

The DAB-containing Substrate Working Solution (CHROM) is prepared by mixing thoroughly 20 µL DAB+ Chromogen (Bottle C) and 1 mL HRP Substrate Buffer (Bottle D). Prepare only the volume required for the number of slides that shall be stained. Use CHROM within 5 days (store in darkness at 2–8 °C).

For preparation of reagents not provided with the kit, please see the instructions included with the individual reagent.

Specimen Collection and Preparation

The specimens may be routinely fixed, paraffin embedded tissue sections and frozen tissue sections.

A variety of fixatives may be used for specimen preservation. Specimens should not be fixed in neutral-buffered formalin for more than 24 hours and preferably for a shorter time.

The optimal thickness of paraffin-embedded sections is approximately 4 µm.

The optimal thickness of frozen sections is 4–6 µm.

The specimens should be mounted on microscope slides. The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

NOTE: The microscope slides must have a width suitable for the Dako instrument. Please refer to the Operator´s Manual for the individual Dako instrument for definition of usable microscope slides.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionized water. The water bath should contain no additives (such as gelatin, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried by heating, generally at a temperature not above 60 °C for a minimum of 60 minutes (e.g. overnight). To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven drying process.

Procedure

Dako automated immunostaining instruments use techniques based on different principles to obtain an optimal staining result. Before running protocols on the Dako automated immunostaining instruments, please read carefully the **Operator's Manual for the dedicated Dako instrument**. After deparaffinization and hydration to buffer (water), most tissue sections should be subjected to HIER. It is recommended to standardize the HIER in order to ascertain reproducible epitope retrieval. To standardize the treatment, it is recommended to load the slide holder fully with slides, even if only one slide may hold tissue; this ensures an identical heating of sections in every run. At the termination of the epitope retrieval step, slides must be left in the buffer for at least 20 minutes at room temperature. During this cooling, the Dako automated immunostaining instruments can be prepared for the staining run. A few epitopes do not tolerate the HIER. Please refer to the package insert for the individual Dako primary antibody for pre-treatment instructions.

Incubation with primary antibody

Dako N-series, Ready-to-Use Primary Antibodies can be used with Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections.

A dilution guideline for Dako concentrated primary antibodies and the use of proteinase K pre-treatment in connection with Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections is provided in the package insert of the concentrated primary antibody.

The concentrated primary antibodies should be diluted in Dako REAL™ Antibody Diluent, code S2022.

The slides are loaded onto a Dako instrument and stained using the dedicated template/protocol for Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, code K5001. If the template/protocol is not present on your Dako Instrument, please contact our Technical Services.

Before using Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, on the Dako Autostainer for the first time it is necessary to add the reagents and times listed in table 1 to the reagent list of the instrument.

Table 1. Necessary additions to the reagent list and optimal incubation times

Reagent	**Code.**	**Suggestion for "short name"**	**Template step**	**Incubation Time**
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution or Dual Endogenous Enzyme Block	S2023 or S2003	HP Block	End. Enz. Block	5 minutes
Dako REAL™ Proteinase K Solution or Dako Proteinase K	S2019 + S2032 S2030	Pro K	Pre-treatment under antibody	10 minutes
Primary antibodies	Individual	-	Antibody	10*–25 minutes
Dako REAL™ Detection System Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5001	K5001LIN	Secondary Reagent	15 minutes
Dako REAL™ Detection System, Streptavidin Peroxidase (HRP)	K5001	K5001HRP	Tertiary Reagent	15 minutes
Dako REAL™ Detection System (DAB+)	K5001	K5001DAB	Substrate	3 minutes (2 times)
Dako REAL™ Hematoxylin or Dako Hematoxylin for the Dako Autostainer	S2020 S3301	-	Auxiliary	1–2 minutes 1–5 minutes
Blueing Buffer (= Autostainer buffer)	S3006	-	Auxiliary	5 minutes

* N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies

For other Dako instruments the reagent names and incubation times are pre-programmed in the templates/protocols.

Quality Control

Each staining run should include a known positive control specimen to ascertain a proper performance of all the applied reagents. If the positive control specimen fails to demonstrate positive staining, labeling of test specimens should be considered invalid.

A negative control reagent should be used with each specimen to identify any non-specific staining. If non-specific staining cannot be clearly differentiated from the specific staining, the labeling of the test specimen should be considered invalid.

Negative Control for N-Series Rabbit Primary Antibodies, code N1699, or Negative Control for N-Series Mouse Primary Antibodies, code N1698, is recommended as negative control reagent.

Interpretation of Results

The diaminobenzidine-containing Substrate Working Solution (CHROM) gives a brown color at the site of the target antigen recognized by the primary antibody. The brown color should be present on the positive control specimen at the expected localization of the target antigen.

If non-specific staining is present, this will be recognized as a rather diffuse, brown staining on the slides treated with the negative control reagent. Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.

Le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse est destiné à être utilisé en immunohistochimie avec les automates de coloration Dako. La trousse est basée sur la méthode streptavidine-biotine encore appelée LSAB (Labeled Streptavidin-Biotin) et est utilisée dans le cadre d'une procédure à trois étapes. La première étape consiste en une incubation du tissu avec un anticorps primaire de lapin ou de souris dilué de façon optimale ; la deuxième étape est une incubation avec l'anticorps secondaire de liaison biotinylé Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) ; enfin la troisième étape est une incubation avec le produit Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP). La réaction est visualisée grâce au chromogène Dako REAL™ DAB+, qui est également inclus dans la trousse. Pour garantir une bonne coloration, il est recommandé d'utiliser cette trousse en association avec d'autres réactifs recommandés – figurant à la section « Matériels requis mais non fournis ».

Résumé et explication

Le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse a été conçu pour offrir une coloration optimale sur les automates de coloration Dako lors de l'utilisation des modèles/protocoles conseillés dans cette notice.

Avant de procéder à la coloration, certaines coupes de tissus fixés en routine et inclus en paraffine doivent être soumises à une procédure de démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) à l'aide de la solution de démasquage des cibles spécifiée dans la notice de l'anticorps primaire. Certains anticorps primaires nécessitent un prétraitement enzymatique du tissu pour une coloration optimale au lieu d'une procédure HIER. Veuillez noter que le produit Dako REAL™ Proteinase K, réf. S2019, est conçu pour être utilisé en association avec une procédure HIER de façon à faciliter le traitement des séries de lames.

La peroxydase endogène doit être bloquée en utilisant le produit Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, réf. S2023, ou le produit Dako Dual Endogenous Enzyme Block, réf. S2003.

En raison d'une procédure de lavage efficace et de la présence de protéines stabilisantes dans les réactifs Dako, des étapes de blocage supplémentaires ne sont pas nécessaires pour réduire la coloration de fond non spécifique.
Il est recommandé d'utiliser le tampon de lavage Dako spécifique à chaque appareil Dako.

Les anticorps primaires ne sont pas fournis dans la trousse. L'utilisation des anticorps Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies ou des anticorps primaires concentrés Dako est recommandée.

Le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse est basé sur une méthode streptavidine-biotine indirecte, laquelle s'est avérée fournir une augmentation de la sensibilité en comparaison avec d'autres méthodes analogues. Le réactif d'anticorps secondaire biotinylé de la trousse réagit de la même manière avec les immunoglobulines de lapin et avec les immunoglobulines de souris ; un seul réactif secondaire étant ainsi nécessaire pour les anticorps primaires de lapin ou de souris. Le réactif d'anticorps secondaire a été marqué de manière optimale avec de la biotine en utilisant un bras espaceur de 7 atomes. Ceci permet à chaque molécule d'anticorps biotinylé de réagir avec plusieurs molécules de streptavidine conjuguée à de la peroxydase et, par conséquent, d'augmenter la sensibilité du système de détection. La streptavidine conjuguée à de la peroxydase de la trousse est préparée à partir de streptavidine issue de *Streptomyces avidinii*, et de peroxydase de raifort hautement purifiée. La conjugaison est réalisée selon une méthode au glutaraldéhyde à deux étapes. Étant donné que le point isoélectrique de la streptavidine est proche de la neutralité, des interactions ioniques non spécifiques avec les composants des échantillons sont évitées. Le réactif d'anticorps secondaire biotinylé ainsi que la streptavidine conjuguée à la peroxydase sont fournis prêts à

l'emploi dans des flacons compte-gouttes et doivent être transvasés dans des récipients appropriés de l'appareil avant utilisation.

Le système du substrat est formé de deux composants, le DAB+ Chromogen, une solution de diaminobenzidine (DAB) concentrée, et un tampon substrat HRP Substrate Buffer contenant du peroxyde d'hydrogène. Avant emploi, le DAB+ Chromogen doit être dilué dans le tampon substrat HRP Substrate Buffer. Le système du substrat forme un produit brun vif sur le site de l'antigène cible.

Les produits Dako REAL™ Hematoxylin, réf. S2020, ou Hematoxylin for the Dako Autostainer, réf. S3301, sont recommandés pour la contre-coloration car ils procurent une coloration bleu clair des noyaux.

Les coupes de tissus colorées peuvent être montées soit avec un milieu de montage aqueux, soit avec un milieu de montage organique à base de solvant.

Réactifs

A. Matériels fournis

Flacon A

LINK, BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODIES (AB2)

Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)
100 mL, prêt à l'emploi
Immunoglobulines de chèvre anti-souris et anti-lapin biotinylées. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et de l'azide de sodium.

La couleur de ce réactif peut varier de jaune foncé à incolore, sans que cela n'ait aucune influence sur la performance de la trousse.

Flacon B

STREPTAVIDIN PEROXIDASE (HRP)

Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)
100 mL, prêt à l'emploi
Streptavidine conjuguée à de la peroxydase de raifort. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur.

Flacon C

DAB+ CHROMOGEN (X 50)

Dako REAL™ DAB+ Chromogen
5 mL, concentré 50x
Tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine dans un solvant organique.

La couleur de ce réactif peut varier de violet foncé à incolore, sans que cela n'ait aucune influence sur la performance de la trousse.

Flacon D

HRP SUBSTRATE BUFFER

Dako REAL™ HRP Substrate Buffer
250 mL, prêt à l'emploi
Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène et un agent conservateur.

B. Matériels requis mais non fournis

Automates de coloration Dako

Tampon de lavage Dako spécifique à chaque appareil

Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, réf. S2023, ou Dual Endogenous Enzyme Block, réf. S2003

Dako REAL™ Proteinase K, réf. S2019, diluée dans le diluant Dako REAL™ Proteinase K Diluent, réf. S2032, ou Proteinase K (Ready-to-Use), réf. S3020 (le cas échéant)

Anticorps Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies ou anticorps primaires de lapin ou de souris concentrés en guise d'alternative provenant de chez Dako

N-Series Ready-to-Use Rabbit or Mouse Universal Negative Control ou réactif de contrôle négatif approprié pour l'anticorps primaire

Dako REAL™ Antibody Diluent, réf. S2022 (pour la dilution des anticorps concentrés)

Dako REAL™ Hematoxylin, réf. S2020 ou Hematoxylin for the Dako Autostainer, réf. S3301

Solution de démasquage des cibles. Consulter la notice de l'anticorps primaire

Bac d'incubation Dako REAL™ Incubation Container, réf. S2030 (facultatif)

Portoir de lames Dako REAL™ Slide Holder, réf. S2029 (facultatif)

Ustensiles pour l'appareil Dako

Lames de microscope

Réactifs généraux de laboratoire pour le déparaffinage des coupes de tissus inclus en paraffine

Milieu de montage (aqueux ou organique à base de solvant) et lamelles

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Le flacon A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), contient des substances d'origine animale. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
3. Le flacon A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), contient de l'azide de sodium (NaN_3), un produit chimique hautement toxique sous sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Ne pas exposer le flacon C, Dako REAL™ DAB+ Chromogen, ou la solution de travail du substrat (CHROM) à une lumière vive.
5. Le flacon C, Dako REAL™ DAB+ Chromogen, contient de 1 % à 5 % de tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine et est désigné comme :
   Nocif.
   R40 Effet cancérogène suspecté – preuves insuffisantes.
   R43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
   R68 Possibilité d'effets irréversibles.
   S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage.
   S33/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.
   En règle générale, il n'est pas permis aux personnes âgées de moins de 18 ans de manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être informés sur les bonnes procédures de travail, les propriétés dangereuses du produit et les instructions de sécurité nécessaires. Veuillez vous reporter à la fiche technique de sécurité (MSDS) pour plus d'informations.
6. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
7. Les solutions inutilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver la trousse entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur la trousse. Ne pas intervertir les composants de la trousse entre différents lots. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles qui sont indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. La solution de travail du substrat (CHROM) doit être conservée dans l'obscurité entre 2 et 8 °C et utilisée dans les 5 jours suivant sa préparation. En cas de coloration inattendue,

ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et de suspicion d'un problème avec le produit, contacter notre service technique.

Préparation des réactifs

Solution de travail du substrat **(CHROM)**
La solution de travail du substrat contenant du DAB (CHROM) est préparée en mélangeant soigneusement 20 µL de DAB+ Chromogen (flacon C) et 1 mL de tampon substrat HRP Substrate Buffer (flacon D). Préparer uniquement le volume nécessaire pour le nombre de lames qui seront colorées. Utiliser le CHROM dans les 5 jours (conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C).

Pour la préparation des réactifs qui ne sont pas fournis avec la trousse, veuillez vous reporter aux instructions incluses avec chaque réactif.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons peuvent être des coupes de tissus fixés en routine et inclus en paraffine et des coupes de tissus congelées.

Divers fixateurs peuvent être utilisés pour la conservation des échantillons. Les échantillons ne doivent pas être fixés dans du formol tamponné neutre pendant plus de 24 heures et de préférence pendant une période plus courte.

L'épaisseur optimale des coupes incluses en paraffine est d'environ 4 µm.

L'épaisseur optimale des coupes congelées est de 4 à 6 µm.

Les échantillons doivent être montés sur des lames de microscope. Les coupes doivent être montées sur les lames aussi plates que possible et avec le moins de plis possible. Trop de plis aura un impact sur les résultats de la coloration.

REMARQUE : Les lames de microscope doivent posséder une largeur adaptée à l'appareil Dako. Veuillez vous reporter au manuel de l'opérateur de chaque appareil Dako pour la définition des lames de microscope utilisables.

Les coupes en paraffine doivent être montées depuis le bain-marie préchauffé contenant de l'eau distillée ou déionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (tel que de la gélatine, de la poly-L-lysine, etc.). Les coupes doivent être séchées en les chauffant, en général à une température ne dépassant pas 60 °C et pendant 60 minutes au minimum (pendant une nuit par exemple). Pour garantir une bonne adhérence des coupes aux lames, il est important d'égoutter l'eau se trouvant sous les coupes avant de passer à la procédure de séchage dans une étuve.

Procédure

Les automates de coloration Dako utilisent des techniques basées sur différents principes afin d'obtenir un résultat de coloration optimal. Avant d'exécuter des protocoles sur les automates de coloration Dako, veuillez lire attentivement le **Manuel de l'opérateur spécifique à l'appareil Dako**. Après le déparaffinage et l'hydratation par tampon (eau), la plupart des coupes de tissus doivent être soumises à une procédure HIER. Il est recommandé de standardiser la procédure HIER de façon à garantir un démasquage d'épitopes reproductible. Pour standardiser le traitement, il est recommandé de charger complètement le portoir de lames avec des lames, même s'il est possible qu'une seule lame contienne un tissu ; cela assure un chauffage identique des coupes dans chaque cycle. À la fin de l'étape de démasquage d'épitopes, les lames doivent être maintenues dans le tampon pendant au moins 20 minutes à température ambiante. Durant ce refroidissement, les automates de coloration Dako peuvent être préparés pour le cycle de coloration. Quelques épitopes ne tolèrent pas la procédure HIER. Veuillez vous reporter à la notice de chaque anticorps primaire Dako pour des instructions relatives au prétraitement.

Incubation avec l'anticorps primaire

Les anticorps Dako N-series, Ready-to-Use Primary Antibodies peuvent être utilisés avec le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, appliqué sur des coupes fixées au formol et incluses en paraffine.

Une directive de dilution pour les anticorps primaires concentrés Dako et l'utilisation du prétraitement à la protéinase K en connexion avec le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, appliquée sur des coupes fixées au formol et incluses en paraffine, est fournie dans la notice de l'anticorps primaire concentré.

Les anticorps primaires concentrés doivent être dilués dans le diluant Dako REAL™ Antibody Diluent, réf. S2022.

Les lames sont chargées sur un appareil Dako et colorées à l'aide du modèle/protocole indiqué pour le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, réf. K5001. Si le modèle/protocole n'est pas présent sur votre appareil Dako, veuillez contacter notre service technique.

Avant d'utiliser le système de détection Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse pour la première fois sur l'automate de coloration Dako Autostainer, il est nécessaire d'ajouter les réactifs et les temps figurant au tableau 1 à la liste de réactifs de l'appareil.

Tableau 1. Ajouts nécessaires à la liste de réactifs et temps d'incubation optimaux

Réactif	**Réf.**	**Abréviation suggérée**	**Étape du modèle**	**Temps d'incubation**
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution ou Dual Endogenous Enzyme Block	S2023 ou S2003	HP Block	Blocage enzyme endogène	5 minutes
Dako REAL™ Proteinase K Solution ou Dako Proteinase K	S2019 + S2032 S2030	Pro K	Prétraitement sous anticorps	10 minutes
Anticorps primaires	Individuel	-	Anticorps	10*–25 minutes
Dako REAL™ Detection System Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5001	K5001LIN	Réactif secondaire	15 minutes
Dako REAL™ Detection System, Streptavidin Peroxidase (HRP)	K5001	K5001HRP	Réactif tertiaire	15 minutes
Dako REAL™ Detection System (DAB+)	K5001	K5001DAB	Substrat	3 minutes (2 fois)
Dako REAL™ Hematoxylin ou Dako Hematoxylin for the Dako Autostainer	S2020 S3301	-	Auxiliare	1–2 minutes 1–5 minutes
Blueing Buffer (= tampon pour l'automate de coloration Autostainer)	S3006	-	Auxiliare	5 minutes

* Anticorps N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies

Pour les autres appareils Dako, les noms des réactifs et les temps d'incubation sont préprogrammés dans les modèles/protocoles.

Contrôle qualité

Chaque cycle de coloration doit comprendre un échantillon de contrôle positif connu pour vérifier la bonne performance de tous les réactifs appliqués. Si l'échantillon de contrôle positif ne présente pas de coloration positive, le marquage des échantillons à analyser doit être considéré comme non valide.

Un réactif de contrôle négatif doit être utilisé avec chaque échantillon afin d'identifier toute coloration non spécifique. Si une coloration non spécifique ne peut pas être clairement différenciée de la coloration spécifique, le marquage de l'échantillon à analyser doit être considéré comme non valide.

Les anticorps Negative Control for N-Series Rabbit Primary Antibodies, réf. N1699, ou Negative Control for N-Series Mouse Primary Antibodies, réf. N1698, sont recommandés comme réactif de contrôle négatif.

Interprétation des résultats

La solution de travail du substrat (CHROM) contenant de la diaminobenzidine produit une couleur brune sur le site de l'antigène cible reconnu par l'anticorps primaire. La couleur brune doit être présente sur l'échantillon de contrôle positif là où l'antigène cible est attendu.
Si une coloration non spécifique est présente, ceci sera identifié comme une coloration brune diffuse sur les lames traitées avec le réactif de contrôle négatif. Les noyaux seront colorés en bleu par le contre-colorant hématoxyline.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse ist für immunhistochemische Verfahren mit Dako-Immunfärbeautomaten bestimmt. Das auf der LSAB-Methode (markiertes Streptavidin-Biotin) beruhende Kit wird in einem Drei-Schritt-Verfahren eingesetzt. Zuerst wird das Gewebe mit einem optimal verdünnten primären Kaninchen- oder Mausantikörper, danach mit Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und zuletzt mit Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP) inkubiert. Die Reaktion wird mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen Dako REAL™ DAB+ Chromogen sichtbar gemacht. Um korrekte Färbeergebnisse zu gewährleisten, wird empfohlen, das Kit nur mit empfohlenen Reagenzien zu verwenden – siehe Abschnitt „Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material“.

Zusammenfassung und Erklärung

Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse wurde so konzipiert, dass bei Verwendung der in dieser Packungsbeilage angegebenen Matrizes/Protokolle optimale Färbeergebnisse mit Dako-Immunfärbeautomaten erzielt werden.

Vor der Färbung sollte für einige routinemäßig fixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit der in der Packungsbeilage des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungslösung erfolgen. Bei einigen primären Antikörpern werden bessere Färbeergebnisse erzielt, wenn anstelle des HIER-Verfahrens eine Gewebevorbehandlung mit Enzymen vorgenommen wird. Bitte beachten, dass für das HIER-Verfahren Dako REAL™ Proteinase K, Code-Nr. S2019 vorgesehen ist, um die Batch-Verarbeitung von Objektträgern zu erleichtern.

Die endogene Peroxidase sollte mit Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, Code-Nr. S2023 oder Dako Dual Endogenous Enzyme Block, Code-Nr. S2003 blockiert werden.

Das wirkungsvolle Waschverfahren und die in den Dako-Reagenzien vorhandenen stabilisierenden Proteine machen weitere Blockierungsschritte zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung überflüssig.
Es wird empfohlen, den speziellen Dako Waschpuffer für das jeweilige Dako-Gerät zu verwenden.

Primäre Antikörper gehören nicht zum Lieferumfang. Wir empfehlen Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies bzw. konzentrierte primäre Antikörper von Dako.

Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse beruht auf einem indirekten Streptavidin-Biotin-Verfahren, das eine nachweislich höhere Empfindlichkeit als analoge Verfahren aufweist. Das den biotinylierten sekundären Antikörper enthaltende Reagenz reagiert gleich gut mit den Immunglobulinen von Kaninchen und Maus, so dass für primäre Kaninchen- oder Mausantikörper nur ein einziges Sekundärreagenz erforderlich ist. Das sekundäre Antikörper-Reagenz wurde mit Hilfe eines Spacerarms aus 7 Atomen optimal mit Biotin markiert. Dadurch wird die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht, denn jedes biotinylierte Antikörper-Molekül kann mit mehreren peroxidasekonjugierten Streptavidin-Molekülen reagieren. Das peroxidasekonjugierte Streptavidin im Kit wurde aus Streptavidin, das aus *Streptomyces avidinii* isoliert wurde, sowie hochgereinigter Meerrettichperoxidase gewonnen. Die Konjugation erfolgt nach einem verfeinerten Zweischritt-Glutaraldehydverfahren. Da der isoelektrische Punkt des Streptavidins nahezu neutral ist, kommt es nicht zu unspezifischen Wechselbeziehungen zwischen den Ionen der Probenkomponenten. Der biotinylierte sekundäre Antikörper sowie das peroxidasekonjugierte Streptavidin werden gebrauchsfertig in Tropffläschchen geliefert und müssen vor Gebrauch in die entsprechenden Behälter des Geräts eingefüllt werden.

Das Substratsystem besteht aus zwei Komponenten: DAB+ Chromogen, einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB-Lösung), und dem wasserstoffperoxidhaltigen HRP Substrate Buffer. Vor dem Gebrauch muss DAB+ Chromogen mit HRP Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratsystem führt zu einem kontrastreichen braunen Endprodukt am Ort des Zielantigens.

Für die Gegenfärbung werden Dako REAL™ Hematoxylin, Code-Nr. S2020 oder Hematoxylin for the Dako Autostainer, Code-Nr. S3301 empfohlen, da sie eine deutliche nukleäre Blaufärbung hervorrufen.

Für die Fixierung der gefärbten Gewebeschnitte eignen sich sowohl Fixiermittel auf wässriger Basis als auch auf Basis organischer Lösungsmittel.

Reagenzien

A. Mitgelieferte Materialien

Fläschchen A

LINK, BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODIES (AB2)

Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)
100 mL, gebrauchsfertig
Biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline. In gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid.

Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig gelb bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

Fläschchen B

STREPTAVIDIN PEROXIDASE (HRP)

Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)
100 mL, gebrauchsfertig
An Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin. In gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Konservierungsmittel.

Fläschchen C

DAB+ CHROMOGEN (X 50)

Dako REAL™ DAB+ Chromogen
5 mL, 50fach konzentriert
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel.

Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

Fläschchen D

HRP SUBSTRATE BUFFER

Dako REAL™ HRP Substrate Buffer
250 mL, gebrauchsfertig
Gepufferte Substratlösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel

B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material

Dako-Immunfärbeautomaten

Spezielle Dako-Waschpuffer für das jeweilige Gerät

Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, Code-Nr. S2023 oder Dual Endogenous Enzyme Block, Code-Nr. S2003

Dako REAL™ Proteinase K, Code-Nr. S2019, verdünnt in Dako REAL™ Proteinase K Diluent, Code-Nr. S2032, oder Proteinase K (Ready-to-Use), Code-Nr. S3020 (soweit erforderlich)

Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies oder andere konzentrierte primäre Kaninchen- oder Mausantikörper von Dako

Dako N-Series Ready-to-Use Rabbit oder Mouse Universal Negative Control oder ein anderes geeignetes Negativkontrollreagenz für den primären Antikörper

Dako REAL™ Antibody Diluent, Code-Nr. S2022 (zur Verdünnung konzentrierter Antikörper)

Dako REAL™ Hematoxylin, Code-Nr. S2020 oder Hematoxylin for the Dako Autostainer, Code-Nr. S3301

Demaskierungslösung. Siehe Packungsbeilage des primären Antikörpers.

Dako REAL™ Incubation Container, Code-Nr. S2030 (optional)

Dako REAL™ Slide Holder, Code-Nr. S2029 (optional)

Zubehör für Dako-Geräte

Mikroskop-Objektträger

Für die Wachsentfernung bei paraffineingebetteten Gewebeschnitten gebräuchliche Laborreagenzien

Fixiermittel (wässrig oder auf Basis organischer Lösungsmittel) und Deckgläser

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Fläschchen A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) enthält von Säugetieren stammendes Material. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
3. Fläschchen A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
4. Fläschchen C, Dako REAL™ DAB+ Chromogen oder die Substrat-Arbeitslösung (CHROM-Lösung) keinem starken Lichteinfall aussetzen.
5. Fläschchen C, Dako REAL™ DAB+ Chromogen, enthält 1–5 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und ist folgendermaßen markiert:
   Gesundheitsschädlich.
   R40 Krebserregende Wirkung nicht auszuschließen.
   R43 Sensibilisierung durch Kontakt mit der Haut möglich.
   R68 Irreversible Schäden möglich.
   S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
   S33/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
   Personen unter 18 Jahren dürfen mit diesem Produkt grundsätzlich nicht arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Weitere Informationen bitte dem Material-Sicherheitsdatenblatt (MSDS) entnehmen.
6. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
7. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Kit aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Kitkomponenten aus unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Werden die Reagenzien anders als unter den genannten Bedingungen aufbewahrt, sind die Bedingungen vom Anwender zu validieren. Die fertige Substrat-Arbeitslösung (CHROM-Lösung) bei 2–8 °C aufbewahren und innerhalb von 5 Tagen verbrauchen. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Reagenzvorbereitung

Substrat-Arbeitslösung **(CHROM)**

Die DAB-haltige Substrat-Arbeitslösung (CHROM) wird durch gründliches Mischen von 20 µL DAB+ Chromogen (Fläschchen C) und 1 mL HRP Substrate Buffer (Fläschchen D) angesetzt. Nur soviel

ansetzen, wie für die zu färbenden Objektträger erforderlich ist. Die CHROM-Lösung innerhalb von 5 Tagen verbrauchen (im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren).

Angaben zum Ansetzen von Reagenzien, die nicht zum Lieferumfang des Kits gehören, bitte den jeweiligen Gebrauchsanweisungen entnehmen.

Entnahme und Vorbereitung der Probe

Geeignet sind routinemäßig fixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte und Gefrierschnitte.

Für die Konservierung der Proben sind verschiedene Fixiermittel geeignet. Die Proben sollten höchstens 24 Stunden (vorzugsweise kürzer) in neutral gepuffertem Formalin fixiert werden.

Die optimale Dicke paraffineingebetteter Schnitte beträgt etwa 4 µm.

Bei Gefrierschnitten liegt die optimale Dicke bei 4–6 µm.

Die Proben auf Mikroskop-Objektträgern fixieren. Die Schnitte sind so flach und faltenfrei wie möglich auf den Objektträgern zu fixieren. Zu viele Falten wirken sich negativ auf die Färbungsergebnisse aus.

HINWEIS: Die Größe der Objektträger muss zum Dako-Gerät passen. Angaben zu geeigneten Mikroskop-Objektträgern bitte dem Bedienungshandbuch des jeweiligen Dako-Geräts entnehmen.

Paraffineingebettete Schnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Zusätze enthalten (wie z.B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden mindestens 60 Minuten lang (z.B. über Nacht) wärmegetrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 °C. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

Verfahren

Um optimale Färbungsergebnisse zu erzielen, arbeiten Dako-Immunfärbeautomaten mit auf verschiedenen Prinzipien beruhenden Verfahren. Das **Bedienerhandbuch des betreffenden Dako-Geräts** vor der Durchführung von Färbungen mit Dako-Immunfärbeautomaten gründlich durchlesen. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Puffer (Wasser) sollte bei den meisten Gewebeschnitten ein HIER-Verfahren durchgeführt werden. Um eine reproduzierbare Demaskierung zu gewährleisten, wird eine Standardisierung des HIER-Verfahrens empfohlen. Zur Standardisierung der Behandlung sollte die Objektträger-Halterung komplett mit Objektträgern beladen werden, auch wenn sich nur auf einem Objektträger Gewebe befindet; hierdurch wird eine einheitliche Erwärmung der Schnitte bei jedem Durchlauf gewährleistet. Nach dem Demaskierungs-Arbeitsschritt müssen die Objektträger mindestens 20 Minuten lang bei Raumtemperatur in der Pufferlösung verbleiben. Während dieser Abkühlphase können die Dako-Immunfärbeautomaten für den Färbedurchlauf vorbereitet werden. Einige wenige Epitope dürfen nicht mit dem HIER-Verfahren behandelt werden. Angaben zur Vorbehandlung bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen.

Inkubation mit dem primären Antikörper

Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies können mit Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden.

Die Packungsbeilage des jeweiligen konzentrierten primären Antikörpers enthält Angaben zur Verdünnung konzentrierter primärer Antikörper von Dako und zur Vorbehandlung mit Proteinase K in Verbindung mit Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten.

Die konzentrierten primären Antikörper sollten mit Dako REAL™ Antibody Diluent, Code-Nr. S2022 verdünnt werden.

Ein Dako-Gerät wird mit den Objektträgern beladen, die unter Zugrundelegung der jeweiligen Matrix/des jeweiligen Protokolls für Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K5001 gefärbt werden. Sollte auf Ihrem Dako-Gerät keine Matrix/kein

Protokoll vorhanden sein, setzen Sie sich bitte mit unserem Technischen Kundendienst in Verbindung.

Vor der ersten Verwendung von Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse auf dem Dako-Autostainer müssen die in Tabelle 1 angegebenen Reagenzien und Inkubationszeiten in die Reagenzienliste des Geräts aufgenommen werden.

Tabelle 1. Notwendige Ergänzungen der Reagenzienliste und optimale Inkubationszeiten

Reagenz	**Code-Nr.**	**Vorschlag Kurzbezeichnung**	**Matrix-Schritt**	**Inkubations-zeit**
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution oder Dual Endogenous Enzyme Block	S2023 oder S2003	HP Block	End. Enz. Block	5 Minuten
Dako REAL™ Proteinase K Solution oder Dako Proteinase K	S2019 + S2032 S2030	Pro K	Vorbehandlung unter Antikörper	10 Minuten
Primäre Antikörper	Individuell	-	Antikörper	10*–25 Minuten
Dako REAL™ Detection System Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5001	K5001LIN	Sekundäres Reagenz	15 Minuten
Dako REAL™ Detection System, Streptavidin Peroxidase (HRP)	K5001	K5001HRP	Tertiäres Reagenz	15 Minuten
Dako REAL™ Detection System (DAB+)	K5001	K5001DAB	Substrat	3 Minuten (2mal)
Dako REAL™ Hematoxylin oder Dako Hematoxylin for the Dako Autostainer	S2020 S3301	-	Zusatz	1–2 Minuten 1–5 Minuten
Blueing Buffer (= Autostainer-Puffer)	S3006	-	Zusatz	5 Minuten

* N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies

Für andere Geräte von Dako sind die Namen der Reagenzien und die zugehörigen Inkubationszeiten bereits in den Matrizes/Protokollen vorprogrammiert.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Färbedurchlauf sollte eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgeführt werden, um die Leistung aller verwendeten Reagenzien zu bestätigen. Wenn das positive Kontrollgewebe keine Färbung aufweist, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung sollte ferner stets eine Negativkontrolle mitlaufen. Ist die unspezifische Färbung nicht eindeutig von der spezifischen Färbung zu unterscheiden, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Als Negativkontrolle werden Negative Control for N-Series Rabbit Primary Antibodies, Code-Nr. N1699 oder Negative Control for N-Series Mouse Primary Antibodies, Code-Nr. N1698 empfohlen.

Auswertung der Ergebnisse

Die Diaminobenzidin enthaltende Substrat-Arbeitslösung (CHROM) erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. Die Braunfärbung muss am erwarteten Ort des Zielantigens auf der Positivkontrolle vorhanden sein.
Eine unspezifische Färbung stellt sich als eher diffuse Braunfärbung der mit der Negativkontrolle behandelten Objektträger dar. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	2 °C – 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Σ Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller
Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Xn Harmful Nocif Gesundheitsschädlich

Produced by/ Produit par/ Hersteller:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Denmark/ Danemark/ Dänemark
Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95